

УДК 543.422.3:615.322

Н. А. Коваленко, кандидат химических наук, доцент (БГТУ);**Г. Н. Супиченко**, кандидат химических наук, ассистент (БГТУ);**В. Н. Леонтьев**, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой (БГТУ);**О. В. Стасевич**, кандидат химических наук, старший преподаватель (БГТУ)**ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ ТРАВЫ ЗВЕРОБОЯ**

Изучены электронные спектры поглощения экстрактов различных видов зверобоя из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Показано, что характер электронных спектров поглощения экстрактов существенно зависит от природы растительного сырья, температуры, полярности растворителей и pH среды. Выявлено, что наиболее перспективным отечественным растительным сырьем является зверобой продырявленный. Оптимизированы условия экстракционного выделения гиперического из травы зверобоя продырявленного, включающие температурный режим и pH среды. На основании спектральных исследований показано, что наибольшая степень извлечения гиперического достигается при использовании этанола и ацетона.

In this study electronic absorption spectra of extracts of St. John's Wort from the collection of Central Botanical Garden of the Belarusian NAS have been investigated. It has been shown that the character of electronic absorption spectra essentially depends on the nature of plant material, temperature, polarity of solvents and pH value of medium. The *Hypericum perforatum* was found to be the most prospective home plant material. The optimal conditions of hypericin extraction from St. John's Wort, including temperature mode and pH value have been established. On the basis of the obtained spectral data, ethanol and acetone have been shown to be the best extractants for isolation of a hypericin.

Введение. Перспективным и активно развивающимся методом лечения злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия. Для успешной реализации фотодинамической терапии онкологических заболеваний необходимо сочетание лазерного облучения и эффективных фотосенсибилизаторов. Основные требования к фотосенсибилизаторам включают в себя высокую селективность к раковым клеткам, низкую токсичность, способность легко выводиться из организма, высокий квантовый выход триплетного состояния с энергией не менее 94 кДж/моль. Большое значение при выборе фотосенсибилизатора имеет также наличие интенсивного поглощения в красной и ближней ИК области спектра.

В современной медицинской практике наблюдается тенденция к расширению использования фитопрепаратов для лечения и профилактики различных заболеваний, поскольку лекарственные средства на растительной основе сочетают в себе широту и мягкость терапевтического действия с отсутствием значительного числа побочных эффектов. По литературным данным, основными источниками получения растительных препаратов фотосенсибилизирующего действия являются лекарственные растения, содержащие производные кумарина и антрахинона. Среди растений, произрастающих на территории Республики Беларусь, наиболее перспективными для извлечения высокоэффективных фотосенсибилизаторов являются различные виды зверобоя, содержащие гиперичесин и его производные. Известно [1], что гиперичесин

обладает достаточно высокой избирательностью к раковым клеткам, не оказывает влияния на нормальные пролиферирующие клетки и быстро выводится из организма. Поэтому оптимизация условий выделения гиперического из отечественного растительного сырья некоторых представителей рода *Hypericum* (семейство *Hypericaceae*) является актуальной задачей.

Для идентификации и определения гиперического в растительных извлечениях применяются различные методы анализа [1–4], однако наиболее доступным и информативным является спектрофотометрический метод. В этой связи изучение спектральных характеристик экстрактов травы зверобоя, различающихся условиями проведения экстракции, представляет научный и практический интерес.

Основная часть. Объектами исследования являлись этанольные экстракты зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L., зверобоя олимпийского *Hypericum olympicum* L., зверобоя густоцветкового *Hypericum densiflorum* L. из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Сбор растений осуществляли в фазу цветения растений в период с июня по август 2012 г. с соблюдением общих правил сбора для этого лекарственного сырья [5]. Воздушно-сухое растительное сырье измельчали до размера частиц 1 мм. Для извлечения гиперического из фитомассы использовали водно-этанольные растворы с массовой долей этанола 50 мас. %. Экстракцию проводили при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в течение 1 ч без доступа дневного света.

Электронные спектры поглощения записывали в диапазоне 400–1100 нм (шаг длины волны 0,1 нм) на приборе Specord-200 в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Температурный интервал составлял 5–65°C с шагом 10°C.

В экспериментах по влиянию полярности растворителя этанольные экстракты подвергали вакуумированию до полного удаления этанола, а твердый остаток растворяли в растворителях различной полярности. Диэлектрическая проницаемость растворителей варьировалась от 2,20 до 78,3.

Для изучения влияния кислотности среды проводили запись электронных спектров поглощения экстрактов в интервале значений pH = 2,0–11,0 с интервалом 0,1. Для доведения pH экстрактов до заданного значения использовали водные растворы NaOH и HCl. Контроль pH осуществляли с помощью pH-метра Hanna HI 8314.

На рис. 1 представлен электронный спектр стандартного образца гиперина в метаноле. Спектр поглощения гиперина в УФ области содержит полосы с максимумами около $\lambda \approx 280$ (белковая полоса) и 330 нм. В видимой области спектра наблюдается широкое плато в интервале длин волн 400–500 нм и присутствуют полосы с максимумами при $\lambda \approx 547$ и 590 нм, причем последняя полоса является наиболее интенсивной. На основании анализа литературы [3] и полученных нами спектральных данных именно эта полоса поглощения с максимумом при $\lambda = (590 \pm 1)$ нм принята в качестве аналитической длины волны гиперина в экстрактах зверобоя.

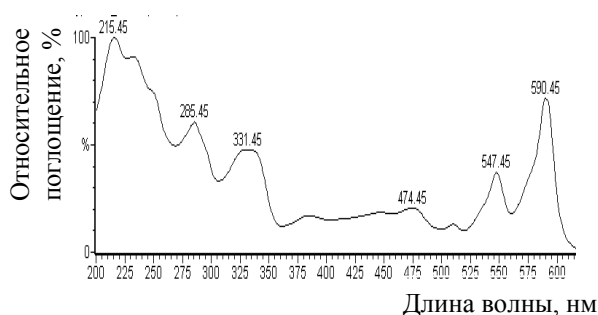


Рис. 1. Электронный спектр стандартного образца гиперина в метаноле

Для скрининга растительного сырья представителей рода *Hypericum*, произрастающих на территории Республики Беларусь, были получены этанольные экстракты из различных видов зверобоя и сняты их электронные спектры поглощения. Фрагменты электронных спектров поглощения полученных экстрактов в видимом интервале длин волн приведены на рис. 2.

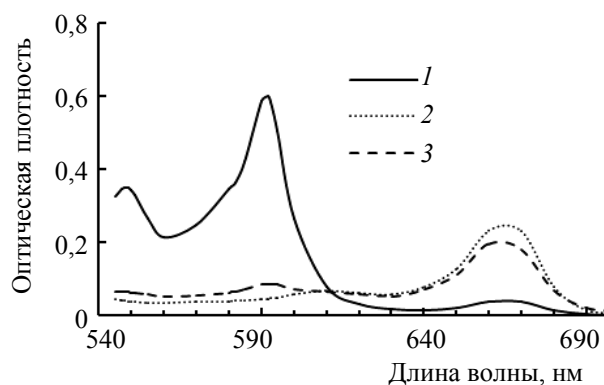


Рис. 2. Фрагмент спектров поглощения экстрактов из различных видов зверобоя

Сравнение интенсивности полос поглощения исследованных образцов при $\lambda \approx 590$ нм показывает, что экстракт зверобоя продырявленного содержит наибольшее количество гиперина (рис. 2, кривая 1). Концентрация гиперина в экстракте зверобоя олимпийского практически на порядок ниже (рис. 2, кривая 2), чем в *Hypericum perforatum*. В экстракте зверобоя густоцветкового гиперин присутствует в следовых количествах (рис. 2, кривая 3).

Таким образом, наиболее перспективным растительным материалом для выделения гиперина является трава зверобоя продырявленного. Поэтому последующие спектральные исследования проводили только с экстрактом *Hypericum perforatum* L.

На рис. 3 приведен типичный электронный спектр поглощения этанольного экстракта зверобоя продырявленного.

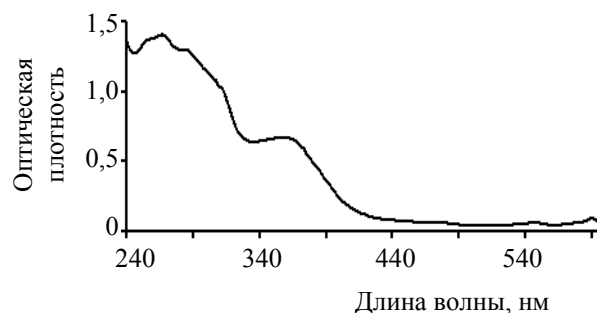


Рис. 3. Электронный спектр поглощения экстракта зверобоя

Сопоставление электронных спектров стандартного образца гиперина и экстракта свидетельствует о наличии общих полос поглощения. Гиперин в экстракте проявляется в виде полос поглощения с максимумами $\lambda \approx 550$ и 590 нм, однако их интенсивность значительно ниже по сравнению со стандартным образцом. Следует отметить, что оптическая плотность экстракта в УФ области существенно превышает таковую в спектре стандартного образца

гиперицина. По видимому, поглощение в УФ области спектра образцов экстрактов связано с наложением полос поглощения как гиперидина, так и сопутствующих соединений, присутствующих в этанольных экстрактах *Hypericum perforatum*.

Известно [1], что положение максимума и интенсивность полос поглощения природных пигментов в существенной мере зависит от ряда факторов, важнейшими из которых являются природа растворителя, pH среды и температура.

Температурная зависимость спектра поглощения экстракта зверобоя в видимой области приведена на рис. 4.

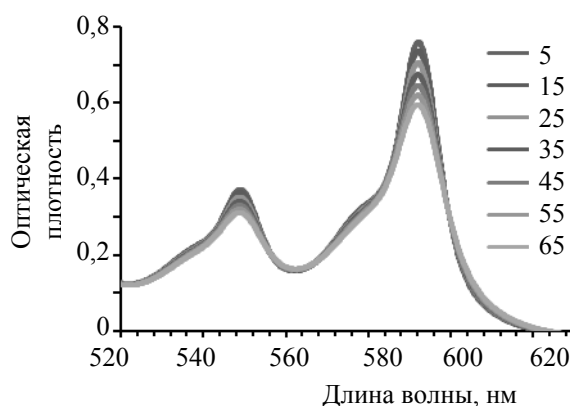


Рис. 4. Влияние температуры на электронный спектр экстракта зверобоя (pH = 5,7)

Видно, что нагревание экстракта приводит к снижению интенсивности поглощения во всем исследуемом интервале длин волн. Наиболее заметное снижение интенсивности поглощения наблюдается в области полосы 590 нм за счет увеличения степени разложения гиперидина.

С целью установления оптимальных условий экстрагирования гиперидина из травы зверобоя было изучено влияние полярности растворителя на спектральные характеристики экстрактов. Значения диэлектрической проницаемости растворителей составляли от 4,22 до 78,30. Анализ полученных спектральных данных показал, что изменение полярности растворителя приводит не только к изменению интенсивности аналитической полосы поглощения гиперидина ($\lambda \approx (590 \pm 1)$ нм), но и к смещению ее максимума в длинноволновую или коротковолновую области.

В таблице приведены данные по влиянию диэлектрической проницаемости растворителей на величину оптической плотности экстрактов зверобоя при длине волны, соответствующей максимуму светопоглощения при длине волны $\lambda \approx 590$ нм.

На рис. 5 приведена зависимость величины оптической плотности при длине волны макси-

мума поглощения ($\lambda \approx 590$ нм) экстракта зверобоя от полярности растворителя.

Влияние природы растворителя на спектральные характеристики экстрактов зверобоя

Растворитель	ϵ	λ_{max} , нм	A
Эфир диэтиловый	4,22	591,7	0,051
Этилацетат	6,00	595,7	0,047
Изо-амиловый спирт	14,70	593,4	0,238
Ацетон	20,74	597,2	0,265
Этиловый спирт	25,80	592,0	0,660
Муравьиная кислота	57,90	578,9	0,432
Вода	78,30	600,2	0,141

Из представленных данных видно, что зависимость носит экстремальный характер. Поскольку содержание гиперидина в исходных этанольных экстрактах было одинаковым, то наблюдаемые спектральные различия при варьировании растворителя связаны как с электронным состоянием самого гиперидина, так и с его различной растворимостью. В этаноле или ацетоне, имеющих близкие значения диэлектрической проницаемости, гиперидин хорошо растворим и находится в мономерной солевой форме. Резкое снижение оптической плотности гиперидина в спектре водного раствора обусловлено низкой растворимостью гиперидина в воде [6].

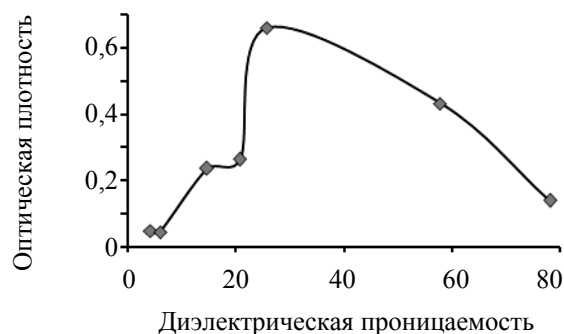


Рис. 5. Влияние полярности растворителя на оптическую плотность экстракта зверобоя при $\lambda \approx 590$ нм

Использование в качестве растворителя муравьиной кислоты приводит к аналогичным спектральным изменениям. В спектре наблюдается снижение оптической плотности при аналитической длине волны гиперидина ($\lambda \approx 590$ нм) за счет уменьшения растворимости гиперидина в кислой среде. Наблюдаемое смещение максимума полосы поглощения при $\lambda \approx 590$ нм в область более коротких длин волн связано с образованием протонированных форм гиперидина [6].

Подтверждением полученных результатов являются данные по влиянию кислотности

среды на спектральные характеристики экстрактов зверобоя. На рис. 6 (а и б) приведены спектры поглощения экстрактов при варьировании pH от 2,3 до 11,2.

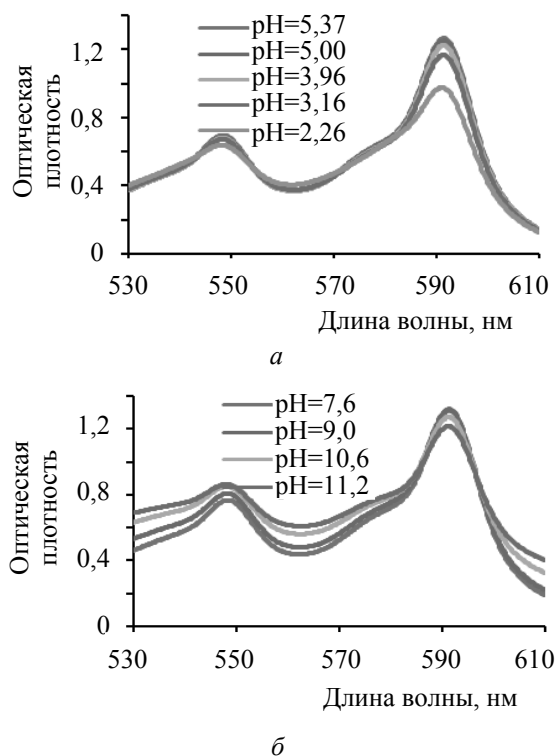


Рис. 6. Влияние кислотности среды на электронные спектры поглощения экстракта зверобоя

Из представленных данных видно, что в кислых растворах (pH = 2,26) интенсивность полосы поглощения при $\lambda \approx 590$ нм мала и увеличивается при повышении pH до 5,37 единиц (рис. 6, а). Наблюдаемые спектральные изменения связаны с образованием в кислых растворах преимущественно протонированных форм гиперическогоина, а также с понижением его растворимости. При повышении pH экстрактов от 5,4 до 9,0 оптическая плотность практически не изменяется (рис. 6, б). По литературным данным [6], в слабощелочных растворах образуются мономерные солевые формы гиперическогоина, хорошо растворимые в воде. Дальнейшее повышение pH среды сопровождается некоторым снижением интенсивности аналитической полосы поглощения гиперическогоина.

Заключение. Таким образом, наиболее перспективным из исследованного нами растительного сырья отечественного происхождения, пригодного для извлечения гиперическогоина, являются растения *Hypericum perforatum* L. Проведенные спектральные исследования позволили установить предпочтительные условия проведения экстракции гиперическогоина из травы зверобоя. Извлечение гиперическогоина необходимо проводить при комнатной температуре, с применением экстрагирующих систем, включающих ацетон или этанол. Интервал значений pH должен составлять 5,4–9,0.

Литература

1. Karioti, A. Hypericins as potential leads for new therapeutics / A. Karioti, A. R. Bilia // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – Vol. 11. – P. 562–594.
2. Mauri, P. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts / P. Mauri, P. Pietta // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 95–99.
3. Правдивцева, О. Е. Сравнительное исследование химического состава надземной части некоторых видов рода *Hypericum* L. / О. Е. Правдивцева, В. А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2009. – № 1. – С. 79–82.
4. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum* / M. Brolis [et al.] // J. Chromatogr., A. – 1998. – Vol. 825. – P. 9–16.
5. Островок здоровья. Правила сбора, сушки и хранения лекарственных трав [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: http://bonoesse.ru/blizzard/RPP/O/Herba/sbor_hran.html. – Дата доступа: 24.01.13.
6. Ломовский, И. О. Исследование механохимической активации гиперическогоина в составе травы зверобоя спектролюминесцентным методом / И. О. Ломовский // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всероссийской конф., 24–26 апр. 2012 г. / под ред. Н. Г. Базарновой, В. И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – 533 с.

Поступила 01.03.2013